

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSITUUT

Epp Ainelu

Metanotroofide identifitseerimine järvesettes ja surusääsevastsete (*Chironomus plumosus*) seedetraktis bakteriaalsete *pmoA* ja *mmoX* geenide esinemise abil

Bakalaureusetöö

Bioloogia eriala

12 EAP

Juhendajad PhD Veljo Kisand

PhD Anu Kisand

TARTU 2016

Metanotroofide identifitseerimine järvesettes ja surusääsevastsete (*Chironomus plumosus*) seedetraktis bakteriaalsete *pmoA* ja *mmoX* geenide esinemise abil

Metaan on kasvuhooneefekti põhjustav gaas, mille kontsentratsiooni atmosfääris mõjutavad inimtegevuse kõrval ka mikroobsed protsessid. Järvesettes toodetakse suur osa looduslikust metaanist, mille vabanemist veekogust atmosfääri takistavad osaliselt metanotroofsed ehk metaani oksüdeerivad bakterid. Selles töös uuriti metaani monooksügenaasi geenide tuvastamise abil metanotroofide esinemist ja mitmekesisust madala suurjärve, Võrtsjärve settes ja vees. Metanotroofe identifitseeriti ka surusääse (*Chironomus plumosus*) vastsete soolesisust, mis näitab metanotroofide kuulumist vastsete toidulauale ning potentsiaalselt ka biogeensest metaanist pärineva süsiniku lülitumist suure madala järve toiduahelasse.

Märksõnad: metaan, metaani oksüdeerivad bakterid, madal järv, surusääsevastseted

CERCS B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia, B260

Hüdrobioloogia, mere-bioloogia, veeökoloogia, limnoloogia

Identification of methanotrophic bacteria in lake sediment and in gut content of *Chironomus plumosus* larvae using *pmoA* and *mmoX* genes

Methane is a major greenhouse gas and its atmospheric concentration is controlled by microbial processes as well as anthropogenic factors. A relatively large part of biogenic methane is produced in freshwater lake sediments, which makes it a habitable environment for methanotrophic (methane oxidizing) bacteria who reduce the amount of gas emitted. In this thesis, methane monooxygenase genes were used as molecular markers to study the occurrence and diversity of methanotrophic bacteria in the sediment and water of lake Võrtsjärv, a large shallow lake. Methanotrophs were also identified in the gut content of *Chironomus plumosus* larvae, which proves that the larvae do graze on methanotrophic bacteria and shows the possibility of potential trophic transfer and integration of the carbon from biogenic methane in the foodweb of a large shallow lake.

Keywords: methane, methane oxidizing bacteria, shallow lake, Chironomid larvae

CERCS B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology, B260 Hydrobiology, marine biology, aquatic ecology, limnology

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Metaan atmosfääris	7
1.2 Biogeense metaani teke	7
1.3 Metaani oksüdeerimine	7
1.3.1 Aeroobne metaani oksüdeerimine	8
1.3.2 Anaeroobne metaani oksüdeerimine	9
1.3.3 Metaani oksüdeerivate bakterite taksonoomia	9
1.4 Metaani liikumine järve toiduvõrgustikus	10
1.5 Metaani roll suure madala järve süsinikuringes	11
1.5.1 Suurte madalate järvede eripära	11
2. Eksperimentaalne osa	13
2.1 Töö eesmärk	13
2.2 Materjal ja meetodika	13
2.2.1 Proovide kogumine	13
2.2.2 DNA ekstraheerimine	15
2.2.3 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)	16
2.2.4 PCR produktide geelelektroforees	18
2.2.5 Sekveneerimine	18
2.3 Tulemused	18
2.3.1 Sekveneerimistulemused	19
2.3.2 Alfaproteobakterite liigirikkus	19
2.3.3 Gammaproteobakterite liigirikkus	21
2.3.4 Metanotroofide varieeruvus surusääsevastsete ja zooplankteri proovides	23
2.3.5 Metanotroofide varieeruvus sette- ja veeproovides	23
2.4 Arutelu	23
Kirjanduse loetelu	27
Lisad	31
Tänuõnad	35
Lihtlitsents	36

Kasutatud lühendid

- MOB – metaani oksüdeeriv bakter, metanotroof
- OTU – *operational taxonomic unit*, taksonoomiline üksus. Siin kasutatud liigi tasemel
- pMMO – *particulate methane monooxygenase*, intratsellulaarne membraaniseoseline metaani monooksügenaas
- sMMO – *soluble methane monooxygenase*, tsütoplasmas vabalt esinev metaani monooksügenaas

Sissejuhatus

Metaan on kasvuhoonegaas, mille kontsentratsiooni atmosfääris mõjutavad nii looduslikud protsessid kui inimtegevus. See on süsihappegaasi järel teine enim Maa kiirgusbilanssi mõjutav gaas (Griggs ja Noguer 2002). Ühed olulisemad metaani kontsentratsiooni mõjutajad on mikroobsed protsessid – gaasi tekib teatud arhede elutegevuse tagajärjel ning teisalt kasutab rühm baktereid, metanotroofid, seda ära enda elutegevuse tagamiseks. Selliste bakterite üheks oluliseks elupaigaks on maismaa mageveekogud. Metaani „söövate“ ja seega kasvuhoonegaasi kontsentratsiooni atmosfääris vähendavate bakterite uurimine ja mõistmine on tähtis. Alles hiljuti on hakatud uurima metaani kui potentsiaalselt olulise kaaluga süsiniku- ja energiaallikat järvede toiduvõrgus ning seejuures on seda protsessi rohkem uuritud sügavate kihistuva veega järvedes (Agasild jt. 2014). Vähem on tähelepanu pööratud madalatele järvedele, kus valitsevad hapnikutingimused on erinevad. Metaanisüsiniku lülitumine madala veekogu toiduahelasse toimub peamiselt põhjaelustiku, seehulgas surusääse (*Chironomus plumosus*) vastsete toitumisel metanotroofidest (Jones ja Grey 2011).

Käesoleva töö eesmärgiks oli markergeenide tuvastamise abil määrata metanotroofide esinemist ning taksonoomilist kuuluvust tüüpilise madala suurjärve, Võrtsjärve settes ja vees. Samuti sooviti teha kindlaks, kas kasutatud meetodiga on võimalik metanotroofe tuvastada ka loomsete organismide soolesisust. Saadud informatsiooni abil on võimalik optimeerida edasiste uuringute metoodikat selles vallas.

Töö koostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Metaan atmosfääris

Metaan (CH_4) on üks olulisi kasvuhoonegaase, mille kontsentratsiooni atmosfääris mõjutavad peamiselt metaani tootvate (metanogeensete) ning metaani oksüdeerivate (metanotroofsete) mikroorganismide tegevuse vahekord (Borrel jt. 2011). Globaalselt vastutavad mikroobsed protsessid 69% õhku paisatava biogeense metaani eest ning 60% ulatuses selle tarbimise eest (Reeburgh 2007). Järvede roll selles on võrreldes nende suhteliselt väikese kogupindalaga üsna märkimisväärne – hinnanguliselt on järvedest pärit 6-16% mitte-inimtekkelisest metaanist (Bastviken jt. 2004) samas kui järvede pindala moodustab Maa pindalast ca 0,9% (Downing jt. 2006). Teised suuremad biogeense metaani allikad on märgalad, üleujutatud riisipõllud, mäletsejate loomade elutegevus, prügimäed (Conrad 2009).

1.2 Biogeense metaani teke

Kõik biogeenset metaani tootvad metanogeenid kuuluvad arhede domeeni (Hedderich ja Whitman 2006). Nad on võimelised kogu elutegevuseks vajaliku energia omandama läbi metanogeneesi, mille üheks produktiks on vaba metaan. Metanogeenideid arhesid leidub arvukalt hapnikuvabades veekihtides ja mageveekogude setetes. Metanogenees on rangelt anaeroobne protsess, kuna selles kasutatakse mitmeid kofaktoreid ja ensüüme, mis on hapnikutundlikud (Borrel jt. 2011). Metanogeenid kasutavad substraadina ühendeid, mis on tekkinud kääritajate organismide elutegevuse tagajärjel, näiteks H_2/CO_2 , formiaat (HCO_2^-), atsetaat (CH_3CO_2^-), metanool (CH_3OH), etanool ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) jm (Garcia jt. 2000).

On kirjeldatud kolme peamist metaani tootmise metaboolset rada. Need eristuvad redutseeritava ühendi alusel, milleks võib olla CO_2 (seejuures elektrondonoriks on H_2), ühend, kus metüülrühm on seotud lämmastiku/hapniku/väävliga või atsetaat. Need erinevat substraati kasutavad metaboolsed rajad on omavahel sarnased metanogeneesi viimases etapis, milles omab võtmerolli metüül-koensüüm M. See ensüüm on ainuomane metanogeenidele ja seda on võimalik kasutada markergeeninina nende tuvastamisel (Hedderich ja Whitman 2006).

1.3 Metaani oksüdeerimine

Metaani ainsa süsiniku- ja energiaallikana kasutavaid baktereid nimetatakse metanotroofideks. Bakterid, kes võivad lisaks metaanile kasvada teistel ühesüsinikulistel

orgaanilistel ühenditel, kuuluvad metülotroofide hulka. Nendeks ühenditeks võivad olla metanool, metüleeritud amiinid, halometaanid jm (Hanson ja Hanson 1996). Metaani oksüdeerimine võib toimuda nii aeroobse kui anaeroobse protsessina. Levinum ja põhjalikumalt uuritud on metaani oksüdeerimise aeroobne metaboolne rada, anaeroobse raja toimimist ei peetud kaua võimalikuks (Thauer ja Shima 2008).

Metanotroofid vajavad keskkonda, kus on kättesaadav nii metaan kui ka hapnik. Metaani tootmine kui anaeroobne protsess toimub järvedes hapnikuvabades settekihtides. Enim metaani oksüdeerimist toimub piirkondades, kus hapnikurikas ehk aeroobne keskkond läheb üle hapnikuvabaks ehk anoksiliseks. Metanotroofid saavad sellisel üleminekualal piisavalt alumistest settekihtidest kerkivat metaani ning hapnikuga rikastatud pindmisest settekihist vajaliku hapniku (Borrel jt. 2011). Vastavalt järve hapnikuolude varieerumisele võib selline hapnikurikka-hapnikuvaba keskkonna üleminekuala ja seega ka metanotroofide elupaik asuda nii settes kui sette kohal olevas vees (Junier jt. 2010).

1.3.1 Aeroobne metaani oksüdeerimine

Enamus aeroobsetest metanotroofidest on obligaatset metaani või metanooli kasutajad. Metaani oksüdeerimine süsihappegaasiks (CO_2) toimub nelja järjestikuse reaktsioonina, kus vaheühenditena esinevad metanool (CH_3OH), formaldehüüd (HCHO) ja formiaat (HCOOH). Esimene reaktsioon, metaani oksüdeerimine metanooliks kasutab ensüümi metaani monooksügenaasi (MMO). See on ainuomane aeroobsetele metanotroofidele ning on kasutatav markergeenina nende tuvastamisel (Hanson ja Hanson 1996). MMO esineb kahe vormina – tsütoplasmas vaba ensüümina sMMO (*soluble methane monooxygenase*) ning intratsellulaarse membraaniseoselise valguna pMMO (*particulate methane monooxygenase*) (Borrel jt. 2011). Ensüümi pMMO suudavad toota peaaegu kõik metanotroofsed bakterid, erandiks *Methyloferula* (Vorobev jt. 2011) ja *Methylocella* (Dedysh jt. 2000) perekonnad *Beijerinckiaceae* sugukonnas. sMMO on omane vaid vähestele rühmadele (Murrell jt. 2000).

Aeroobsed metanotroofid jagatakse kolmeks tüübiks formaldehüüdi assimileerimisraja alusel. I tüüpi MOBid kasutavad ribuloosmonofosfaadi rada, II tüüpi MOBid seriini metabolismirada. Tüüp X metanotroofid kasutavad samuti ribuloosmonofosfaadi rada, kuid omavad ka seriini metabolismi rajale omaseid ensüüme ning võivad elada kõrgematel temperatuuridel kui tüübid I ja II metanotroofid (Hanson ja Hanson 1996).

1.3.2 Anaeroobne metaani oksüdeerimine

Metaani oksüdeerimine hapniku juuresolekuta on vähem uuritud protsess. Selle toimumise võimalikkus mageveekogudes avastati 1970ndate lõpus (Panganiban jt. 1979, Zehnder ja Brock 1980). Alternatiivsete elektronaktseptoritena kasutavad anaeroobsed metanotroofid nitraati, nitritit, sulfaati või metalliühendeid (Fe(OH)_3 ja MnO_2) (Borrel jt. 2011).

Sulfaadi redutseerimisega seotud protsessid toimuvad metanogeensete arhede ja sulfaati redutseerivate bakterite koostöös, kus arhed viivad läbi pööratud metanogeneesi (Hinrichs jt. 1999, Boetius jt. 2000). Mangaani ja raua kasutamise kohta on vähem teada, kuid nende metallide laialdase kättesaadavuse põhjal veekogude setetes võib eeldada, et sellised protsessid on globaalselt laialt levinud (Beal jt. 2009). Nii sulfaadi kui ka metallide kasutamist elektronaktseptorina on kirjeldatud nii mere- kui magevees.

Nitraadi ja nitriti tarbimine toimub teadaolevalt vaid magevees, kuhu need ühendid jõuavad põllumajandustegevuse ja fossiilsete kütuste kasutamise tagajärjel (Galloway jt. 2008). Lämmastikühendite kasutamine toimub denitritifitseerivate bakterite ning metanotroofsete arhede kooslustes (Raghoebarsing jt. 2006).

1.3.3 Metaani oksüdeerivate bakterite taksonoomia

Kõik teadaolevad aeroobselt metaani oksüdeerivad organismid kuuluvad bakterite domeeni, milles nad moodustavad polüfüleetilise grupi – sellesse ei kuulu nende ühine eellane. Metanotroofid on valdavalt neutrofiilsed ja mesofiilsed, kuid on kirjeldatud ka mõõdukalt atsido-, alkali-, termo- ja psührofiilseid liike. Aeroobsed metanotroofid jagunevad nelja sugukonna vahel: *Methylococcaceae* (kuuluvad klassi gammaproteobakterid), *Beijerinckiaceae* ja *Methylocystaceae* (klassis alfabroteobakterid) ning *Methylacidiphilaceae* (hõimkonnas *Verrucomicrobia*) (Op den Camp jt. 2009, Knief 2015).

Tüüp I metanotroofid kuuluvad *Methylococcaceae* sugukonda ning kasutavad ribuloosmonofosfaadi ainevahetusrada. See on liigirikkaim sugukond metanotroofide seas – siia kuulub 12 perekonda, näiteks *Methylococcus*, *Methylocaldum* ja *Methylobacter*.

Methylocystaceae hulka kuulub kaks perekonda, *Methylocystis* ja *Methylosinus*. Nad on II tüüpi metanotroofsed bakterid, kes kasutavad seriini ainevahetusrada (Op den Camp jt. 2009). *Beijerinckiaceae* sugukonda kuuluvad organismid varieeruvad metabolismiradades – on nii obligaatseid ja fakultatiivseid metanotroofe kui ka mitte-metanotroofe. Sugukonnas on kaks perekonda. *Methylocella* on üks erandlikest taksonitest, kes ei oma pMMO-d ning kasutab metaani metaboliseerimises sMMO-d. (Dedysh jt. 2000). *Methylocapsa* esindajad on

mõõdukalt atsidofiilsed (Dunfield jt. 2010). Mõlemasse metanotroofe sisaldavasse alfaproteobakterite sugukonda kuulub ka mittemetanotroofseid perekondi.

Methylacidiphilaceae on väike sugukond ühe perekonnaga *Methylacidiphilum*, kuhu kuuluvad liigid on atsidofiilsed ja termotolerantsed, kasvades isegi pH 0,8 juures ning temperatuuril kuni 65°C (Pol jt. 2007, Hou jt. 2008, Islam jt. 2008).

1.4 Metaani liikumine järve toiduvõrgustikus

Biogeense metaani liikumist toiduvõrgus saab jälgida süsiniku stabiilsete isotoopide analüüsiga. Süsinikul esineb kaks stabiilset isotoopi ^{12}C ja ^{13}C , mille suhtelisi koguseid väljendatakse $\delta^{13}\text{C}$ -na. Biogeensele metaanile on iseloomulik ^{13}C vaesus, selle tüüpiline $\delta^{13}\text{C}$ väärtus on märkimisväärselt madal: -60 kuni -70‰ (Conrad jt. 2007, Jędrysek 2010). Võrdluseks, fütoplanktonil on $\delta^{13}\text{C}$ keskmiselt -10 kuni -20‰ (Vuorio jt. 2006) ning maismaa C3-taimedel -28‰ (Peterson ja Fry 1987). Stabiilsete isotoopide suhe kannab informatsiooni reaktsioonitingimuste ja substraadi päritolu kohta, mis teeb võimalikuks orgaanilise aine päritolu ja liikumise jälgimist toiduahelates. Loomsete organismide süsiniku stabiilsete isotoopide suhe on sarnane nende toidulauda moodustava orgaanika $\delta^{13}\text{C}$ ga (Peterson ja Fry 1987).

Biogeense metaani sisenemine järve toiduahelasse saab toimuda peamiselt bentose ehk põhjaelustiku kaudu, kuna võtmelüliks olevad metanotroofid elutsevad valdavalt järve põhjasetetes. Üheks esimesena avastatud ning enim uurituimaks settes elutsevaiks MOBidest toitujateks on surusääse (*Chironomus plumosus*) vastsed (Bunn ja Boon 1993, Jones ja Grey 2011). Surusääsed elavad vastsestaadiumis veekogudes. Nad uuristavad settesse käike, mis ulatuvad ka anaeroobsesse settekihti. Elupaiga hapnikuga varustamiseks teevad vastsed käikudes kehaga lainetavaid liigutusi, mis pumpab hapnikuga varustatud vett läbi käikude. Anoksilises settes tekivad käigutorudes hapnikuga rikastatud piirkonnad, mis koos sügavamatest settekihtidest kerkiva metaaniga pakuvad soodsat elupaika metanotroofsetele bakteritele (Jones ja Grey 2011).

$\delta^{13}\text{C}$ väärtus surusääsevastsetes on leitud olevat -40,4 kuni -29,8‰ samal ajal kui sette orgaanilises aines (SOM, *soil organic matter*) ja veekogus settivas tahketes orgaanilise aine osakestes (POM, *particulate organic matter*), mis on teadaolevalt surusääsevastsetele põhiliseks toiduks, olid vastavad väärtused -28,1 ja -33,4‰. (Yasuno jt. 2012). See viitab sellele, et osaliselt pärineb vastsete poolt omastatud süsinik alternatiivsest allikast, biogeensest metaanist.

1.5 Metaani roll suure madala järve süsinikuringes

Järvi ja teisi mageveelisi ökosüsteeme on kaua peetud globaalses süsinikuringes vaid maismaa ja ookeani vahel vahendaja rolli omavateks. Klassikaliselt kujutatud süsinikuringe sisaldab lisaks neile kahele ühe komponendina ka atmosfääri. Maismaaveekogude aktiivsele rollile süsiniku fikseerimises ja vabastamises on hakatud alles hiljuti tähelepanu pöörama (Bolin jt. 1981, Cole jt. 2007).

1.5.1 Suurte madalate järvede eripära

Valdav osa järvedes tekkiva metaaniga seotud uuringuid on läbi viidud kihistunud järvedes, kus hüpolimnionis ehk kõige alumises veekihi valitseb hapnikuvaba keskkond. Sellistes järvedes on metanotroofide arvukuse kõrgaeg sügisel, kui pealmine veekiht jahtudes tiheneb, muutub raskemaks ja vajub alla. Sügavamad veekihid saavad hapnikuga varustatud ning tekivad selliste bakterite paljunemiseks soodsad tingimused (Grey jt. 2004, Kankaala jt. 2010). Madalates järvedes suvist kihistumist ei teki ning settepind on pidevalt hapnikuga varustatud. Suure pindalaga lai veeväli on avatud tuulte mõjudele, mis tagab veekihtide ühtlase vertikaalse segunemise ning ei lase tekkida ka temperatuuripõhisel kihistumisel. Vee liikumine madalas järves resuspendeerib sette pealmist kihti, mis eriti suvel vetikate vohamise ajal põhjustab vee hägusust (Agasild jt. 2014).

Võrtsjärv on suur (270 km²) ja madal (keskmine sügavus 2,8 m, suurim sügavus 6 m) eutroofne ehk kõrge toitainete sisaldusega järv. Järve põhjapoolses ja keskmises osas domineerib primaarprodutsentide osas fütoplankton. Võrtsjärve lõunaosa on kitsam ja väga madal (keskmine sügavus <1,5 m) ning seal domineerivad makrofüüdid (Agasild jt. 2014).

On leitud, et võrreldes sügavamate, kihistunud veesambaga järvedega võib madalas järves metaani tootmine toimuda aasta lõikes pikema aja jooksul ning vähem intensiivselt (Yasuno jt. 2012). Lahustunud hapniku kontsentratsioon võib madalates järvedes alaneda just makrofütide poolt moodustatud vegetatsioonikatte all, mis tekitab pindmises settes soodsa keskkonna metaani produktsiooniks. Sellised tingimused on ka Võrtsjärve lõunaosas, mis teeb metaanisüsiniku lülitumise toiduahelasse võimalikuks suure osa vegetatsiooniperioodi jooksul (Agasild jt. 2014).

Surusääsevastsete stabiilsete süsiniku isotoopide uurimine Võrtsjärves on näidanud keskmist $\delta^{13}\text{C}$ väärtust $-37,1 \pm 0,4\text{‰}$ (Cremona jt. 2014), kuid on leitud varieeruvat vahemikus -64 kuni $-32,3\text{‰}$ (Agasild jt. 2014). Võrtsjärve madalamas lõunaosas võib biogeenne metaan hooajaliselt olla energiaallikaks nii bentose- kui ka vähemal määral pelaagilises toiduahelas.

Metaanisüsiniku fikseerumine toiduvõrgustiku kõrgematel troofilistel tasanditel on tõenäolisem madalates makrofüütide poolt domineeritud veeökosüsteemides, kus põhja- ja avaveelustik on lähemalt seotud (Agasild jt. 2014).

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärk

Antud töö eesmärgiks on saada selgust metaani oksüdeerivate bakterite esinemise ja liigilise koosseisu kohta suure madala järve vees, settes ning settes elutsevate surusääsevastsete sooles. Vastsetele võrdluseks võeti uurimiseks ka vees elava zooplakteri maosisu. Valdav osa uuringuid metaanisüsiniku integreerumisest järveloomastiku biomassi on tehtud sügavate, tugevalt kihistuva veega järvedes, kuid madalate järvede kohta ulatuslikud andmed puuduvad. Selles töös uuriti, kas esineb erinevusi metanotroofide esinemise vahel avaveepiirkonna ja varjulise makrofüütidega kaetud põhjapiirkonna settes. Esitati küsimus, kas MOBe on võimalik tuvastada ka avatud, hästi aereeritud piirkonna veest ning varjulise vähem aereeritud mudase koha pindmisest settest. Surusääsevastete maosisu uuriti sooviga leida otsest tõestust sellele, mida stabiilsete isotoopide analüüs Võrtsjärves on varasemalt vihjanud – et osa vastsete dieedist moodustavad metanotroofsed bakterid.

Käesolev bakalaureusetöö on esimene etapp laiemas uurimuses, mille eesmärgiks on tuvastada metaanisüsiniku lülitumist Võrtsjärve bentilisse ning potentsiaalselt ka pelaagilisse toiduahelasse. Minu töö kaasnev eesmärk on metoodika optimeerimine edasiste uuringute jaoks ning selgitada, kas kasutatud väikese proovikoguse juures on MOBide esinemine tuvastatav. Samuti sooviti näha, kas antud meetodeid kasutades on võimalik metanotroofe tuvastada surusääsevastsete väljaheidetest.

2.2 Materjal ja metoodika

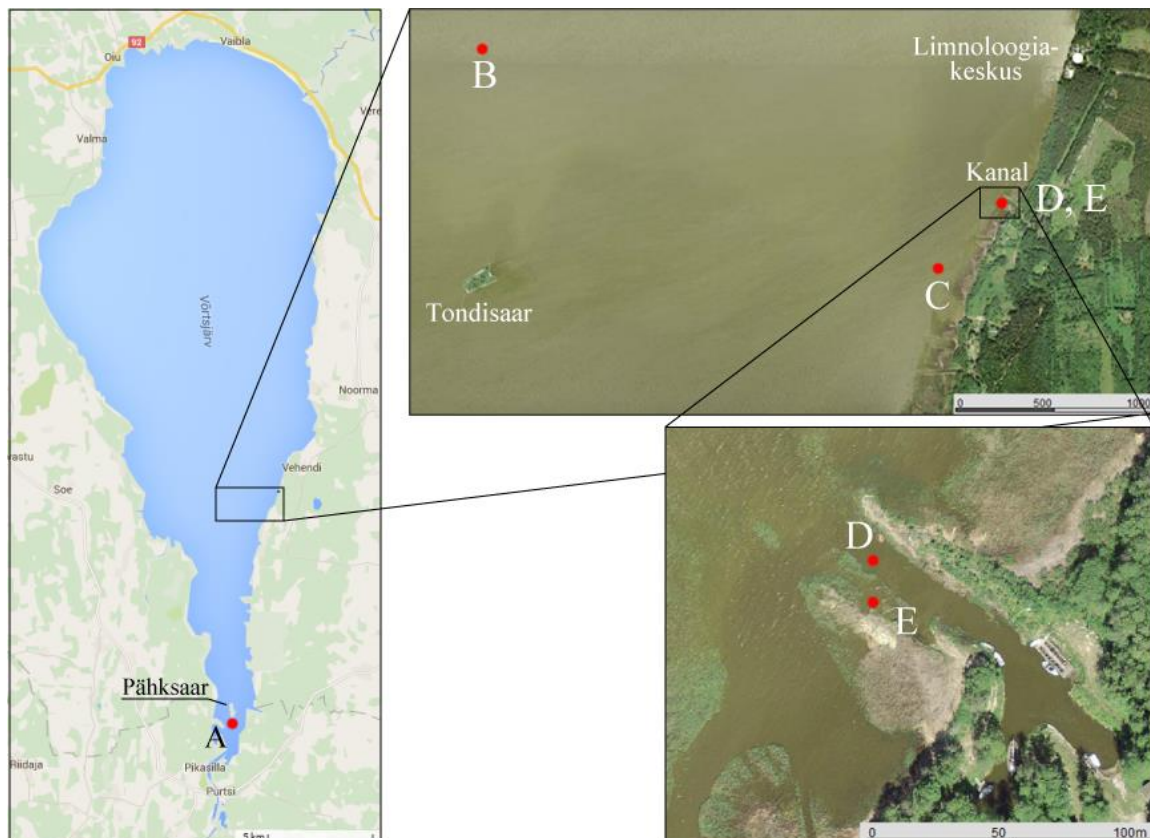
2.2.1 Proovide kogumine

Sette- ja veeproovid koguti 2015. aasta juuni lõpus ning augusti keskel Võrtsjärvest Limnoloogiakeskuse lähedalt ($58^{\circ}12'41.4''N$ $26^{\circ}06'35.5''E$). Proovid võeti Willner-tüüpi gravitatsioonilise settepuuriga läbipaistvatesse 40 cm pikkustesse 6,4 cm diameetriga akrüülitorudesse. Sete koguti nii, et torusse jäi puursüdamiku (kärni) kohale sette-vee piirpind ning vähemalt 10 cm sette kohal olevat vett. Proovid, mille maht oli ligikaudu 0,5 ml, võeti settepinnalt 0 cm, 0,5 cm ja 1 cm sügavuselt, seejuures igast sügavusest koguti kolm paralleelset proovi. Joonis 1 punkt D-st pärit kärni kogutud settesammas oli pinna lähedal gaasimullide tõttu veidi segunenud ning seetõttu oli kogumissügavuste täpne määramine raskendatud. Proovid võeti kahelt sügavuselt, mis tähistati 0-0,5 cm ning 0,5-1 cm. Liivasema settepinna kohalt (joonis 1, punkt C) koguti kaks veeproovi mahuga 100 ml ning mudasemalt kohalt (joonis 1,

punkt D) kaks proovi mahuga 60 ml. Vesi filtreeriti läbi 0,22 µm poorisuurusega polükarbonaatfiltrit. Materjali säilitati -20°C juures.

26. juunil koguti kolm kärni, üks avaveelisest piirkonnast liivasema settega asukohast (joonis 1, punkt C) ning kaks kärni paadisadama kanalist, mis on madalam ning makrofüüdi-domineeritud ala. Kanalist orgaanikarikka sette proovi (joonis 1, punkt D) võtu ajal eraldus pinnasest gaasimulle, mis võisid olla metaani- või süsihappegaasi mullid. Kanali proovivõtukoht (joonis 1, punkt E) oli tiheda taimestikuga varjuline sopp ning veesamba alumine põhjalähedane kiht kannatada hapnikupuuduse all. 18. augustil koguti proovid (joonis 1, punkt B) aereeritud, avaveelise piirkonna liivasemast settest.

Surusääsevastsed (*Chironomus plumosus*) koguti Eesti Maaülikooli Limnoloogiakeskuse töötaja Helen Agasilla poolt Pähksaare lõunaosa roostiku kõrvalt 2014. aasta 17. septembril, 22. oktoobril ja 26. novembril ning zooplankterid samast kohast 2014. aasta 13. mail (joonis 1, punkt A). Surusääsevastseid koguti iga kolme proovi puhul umbes 10 isendit. Isendeid inkubeeriti 5 tundi filtreeritud (0,22 µm filtriga) bakterivabas järvevees, mille jooksul vastsed väljutasid soolesisu. Tahked soolesisu osakesed filtreeriti 0,22 µm poorisuurusega filtrile. Järveveest eraldatud zooplanktereid inkubeeriti samuti 5 tundi filtersteriliseeritud järvevees ning koguti seejärel kolmele filtrile. Kahe proovi puhul eraldati loomad kasutades planktonvõrku (võrgusilma läbimõõduga 300 µm) ning filtrile kogutud ning hiljem uuritud proovid sisaldasid ainult loomade poolt eritatud soolesisu. Ühele filtrile jäeti lisaks soolesisule ka loomad peale. Kõik filtrid säilitati 2 ml Eppendorfi katsutites -18°C juures edasisteks analüüsideks.



Joonis 1. Proovide kogumiste kohad. Võrtsjärve lõunatipu lähedal asuva Pähksaare lähedusest (punkt A) koguti surusääsevastsete ja zooplanktoni proovid. Punktist B on pärit 2015. aasta augustis kogutud setteproovid. 2015. aasta juunis võeti proovid punktidest C (liivasem sete, aereeritud veega piirkond), D ja E. Viimased kaks punkti on orgaanikarikka settega, makrofüüdirohkest piirkonnast kanalis.

2.2.2 DNA ekstraheerimine

DNA ekstraheerimine sette- ja veeproovidest toimus firma MO BIO Laboratories, Inc protokollil PowerSoil DNA Isolation Kit järgi. Osadest setteproovidest eraldati DNA firma Stratec RTP Bacteria DNA Mini Kit järgi, et katsetada erinevate meetodite kasutamise mõju DNA saagisele. PowerSoili protokollil muudeti kahes punktis - proovidele lisati PowerBead terakesed, mitte vastupidi, ning esimene väristamine viidi läbi 10 minuti asemel 55 sekundit Fast Prep®-24 (MP Biomedicals) homogenisaatoril. Strateci manuaali muudeti samuti – teises punktis lisati setteproovile (100-200 µl) 400 µl asemel 500 µl resuspensiooni puhvrit, seejärel lisati tsirkooniumi terakesed ning tuube tsentrifuugiti 55 sekundit 6 m/s. Supernatant tõsteti Extraction Tube'i ning proove tsentrifuugiti 5 minutit 2500 g juures. Supernatant tõsteti uude tuubi ning lisati 500 µl kloroformi, proove väristati 15 sekundit ning tsentrifuugiti 15 minutit 12 200 g juures. Supernatant eraldati, lisati 400 µl Binding Buffer B6 ning materjal kanti RTA-

Spin Filtrile. Tuube inkubeeriti 37 °C juures 5 minutit, seejärel tsentrifuugiti 2 minutit 11 000 g juures. Edasi lähtuti protokollist kuni viimase Elution Bufferi lisamiseni – RTA-Spin Filtrile pipeteeriti 200 µl elueerimispuhvri asemel väiksem kogus kahes osas – esmalt 60 µl, proove inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit, tsentrifuugiti 1 minut 11 000 g juures ning seejärel lisati 40 µl elueerimispuhvrit, inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit ning tsentrifuugiti 1 min 11 000 g juures. DNAd säilitati -20°C juures.

2.2.3 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)

Metaani oksüdeerivate bakterite tuvastamiseks kasutati kahte praimeripaari (tabel 1):

- 1) A189f-mb661r tuvastamaks pMMO β-subühiku geeni *pmoA*
- 2) mmoXf-mmoXr tuvastamaks sMMO α-subühiku geeni *mmoX*

Esimene paar on hea amplifitseerimaks ainult *pmoA*-d (pMMO geen) ning mitte sarnase aminohappelise ülesehituse ning struktuuriga ensüümi ammoniaagi monooksügenaasi (AMO) geeni *amoA*-d (Costello ja Lidstrom 1999). Alternatiivsed praimeripaarid A189-A682 ning A189-A650 paljundavad mõlema ensüümi geenifragmente ning seega annavad infot ka ammooniaaki kasutavate bakterite kohta. Võrreldes alternatiivsete praimeripaaridega suudeti A189-mb661 paari kasutades proovides tuvastada suurim mikroobide mitmekesisust ning paar oli ka tulemuslikum mageveekogudest pärit proovide analüüsil (Bourne jt. 2001).

Praimer	Järjestus 5' -> 3' suunas	Sihtmärkgeen	Viide
A189gc	GGNGACTGGGACTTCTGG	<i>pmoA</i>	(Costello ja Lidstrom 1999)
mb661	CCGGMGCAACGTCYTTACC		
mmoX f882	GGCTCCAAGTTCAAGGTCGAG C	<i>mmoX</i>	(McDonald jt. 1995)
mmoX r1403	TGGCACTCGTAGCGCTCCGGCT CG		

Tabel 1. PCRis kasutatud praimeripaarid.

PCR viidi läbi kahe sammuna (joonis 2). Esimeses sammus seondus matriits-DNAGA praimer, mille otsas oli Illumina adapterjärjestus. Teises sammus seondus sellega komplementaarne adapterjärjestus, mis oli seotud indeksjärjestuse ja P5/P7 sabaga. Reaktsioonisegu maht oli mõlemal puhul 20 µl, mis esimeses etapis sisaldas High-Fidelity 1x Phusion Master Mix-i (Thermo Scientific), mõlemat praimerit 0,5 µM, BSA-d 1 mg/ml, matriitsina 1 µl keskkonnast eraldatud DNA-d ning lõppmahuni viimiseks H₂O. Teises etapis kasutatud reaktsioonisegu sisaldas 1x Phusion Master Mix-i, Mplex PCR praimerit 0,5 µM, indeksjärjestus 0,5 µM, matriitsina 1:20 lahjendatud, surusäase- ja zooplankteri proovide puhul

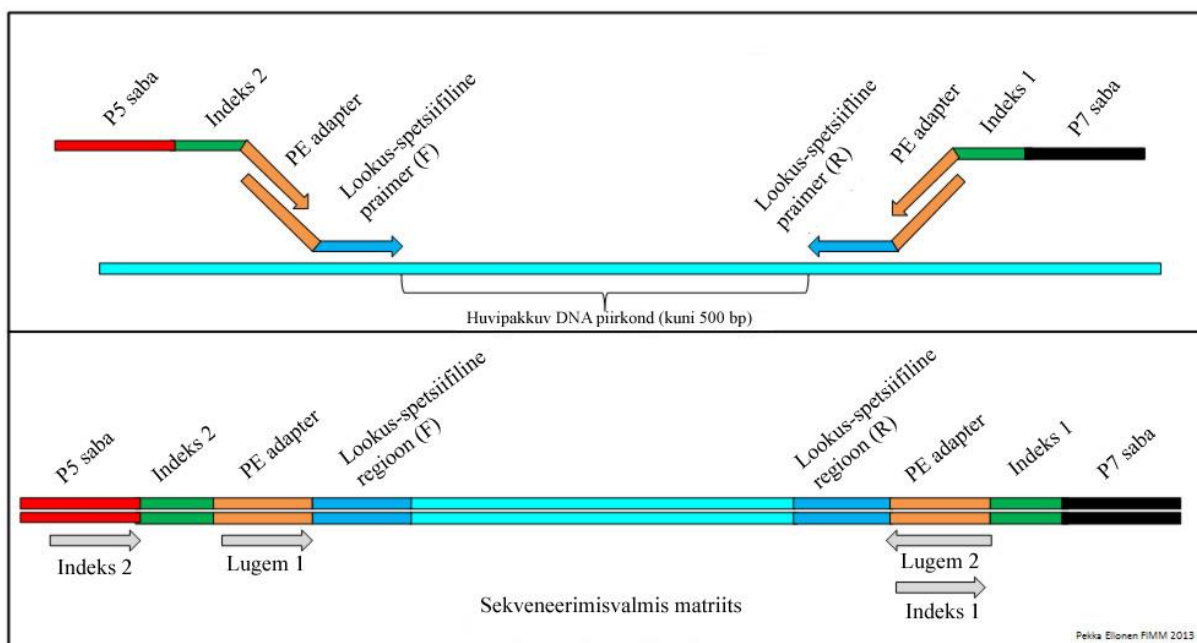
lahjendamata 1 µl PCR 1 produkti, ning lõppmahuni viimiseks H₂O. Kõik reaktsioonid viidi läbi Eppendorfi masinas.

PCR programm esimeses sammus

Algne denaturatsioon	98 °C	30 sek	32 tsüklit
DNA denaturatsioon	98 °C	10 sek	
Praimerite seondumine	65 °C	30 sek	
DNA süntees	72 °C	15 sek	
Lõplik elongatsioon	72 °C	10 min	

PCR programm teises sammus

Algne denaturatsioon	98 °C	2 min	12 tsüklit
DNA denaturatsioon	98 °C	20 sek	
Praimerite seondumine	65 °C	30 sek	
DNA süntees	72 °C	30 sek	
Lõplik elongatsioon	72 °C	5 min	



Joonis 2. Kaheastmeline PCR. Esimeses etapis liidetakse DNAGA lookus-spetsiifilised praimerid koos adapterotstega (PE, *paired end* adapter). Teises etapis liidetakse adapteri kaudu indeksjärjestused, mis võimaldavad sekveneerimisel proove eristada (nn multipleximine). FIMM (<https://www.fimm.fi/en/services/technology-centre/sequencing/next-generation-sequencing/amplicon-libraries-pcr>), muudetud.

Surusääsevastsete ning zooplankteri maosisust eraldatud DNA-ga, mida oli seitse proovi (4 surusääse ning 3 zooplankteri), viidi PCR-i esimene etapp läbi kolm korda. Saadud kolm paralleelset produkti kontsentreeriti enne teise PCR etapi läbiviimist. Selleks kasutati Zymo Researchi Select-a-Size DNA Clean ja Concentrator protokollid.

2.2.4 PCR produktide geelelektroforees

PCR produktide analüüsiks kasutati geelelektroforeesi. Valmistati 1,4% agarosgeel, mis sisaldas 1x TAE puhvrit (40 mM Tris, 20 mM etaanhape, 1mM EDTA pH 7,4) ning etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,3 µg/ml. PCR produktide kontrolliks kasutati suurusmarkerina 1 kb DNA markerit (GeneRuler™ 1 kb+ DNA Ladder, Thermo Scientific). Produktide geelile kandmiseks kasutati markervärvi (6x Loading Dye, Thermo Scientific). Elektroforees toimus pingel 110 volti ning seejärel visualiseeriti geel UV valguses.

2.2.5 Sekveneerimine

Proovid saadeti sekveneerimisele FIMMi (*Institute for Molecular Medicine Finland*).

Enne saadud sekveneerimistulemuste analüüsi trimmiti esmalt välja nukleotiidid, mille täpsusprotsent oli alla 99% (Phred kvaliteediskoor <Q20). Seejärel eemaldati järjestused, mis olid lühemad kui 200 bp. Vastavate *single-end* järjestuste liitmine terve, *paired-end* järjestuse saamiseks tehti minimaalse kattuvusega 3 bp. Järjestused klasterdati *pmoA* geeni 86% samasuse alusel, mis vastab 16S rRNA järjestuste kattuvusele 97% ulatuses ning seega viitab organismide kuuluvusele ühte liiki (Wen jt. 2016). Saadud klastreid võrreldi *pmoA* geeni andmebaasiga (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sekveneerimise toorandmete esmast analüüsi ei viinud läbi töö autor.

2.3 Tulemused

PCRi läbiviimine võimaldas kontrollida, kas surusääse, zooplankteri ja setteproovides leiduvas bakteriaalse DNA hulgas on metanotroofidele omaseid *pmoA* ja *mmoX* geene ja seega, kas proovivõtukohas elavad MOBid. PCRi järel tehtud geelelektroforeesi pildid näitasid, et *mmoX* geeni, mis kodeerib sMMO subühikut, tuvastati vaid neljas keskkonnaproovis 40-st. *mmoX* leidis kanali keskelt filtrile võetud veeproovist (joonis 1, punkt D), kanali mudaseima koha settepinnalt (0 cm) ning sama koha 0,5 cm ja 1 cm sügavuselt võetud proovides. *mmoXi* ei tuvastatud ühestki augustis võetud proovist ega surusääse või zooplankteri proovidest.

pmoA geeni tuvastati igast sügavusest nii juunis kui augustis võetud setteproovist. Samuti kanali keskmise koha veeproovist, kuid mitte liivase pinnase (joonis 1, punkt C) kohal olnud ega augustis kogutud veest.

PCR tulemused on esitatud lisas 1.

2.3.1 Sekveneerimistulemused

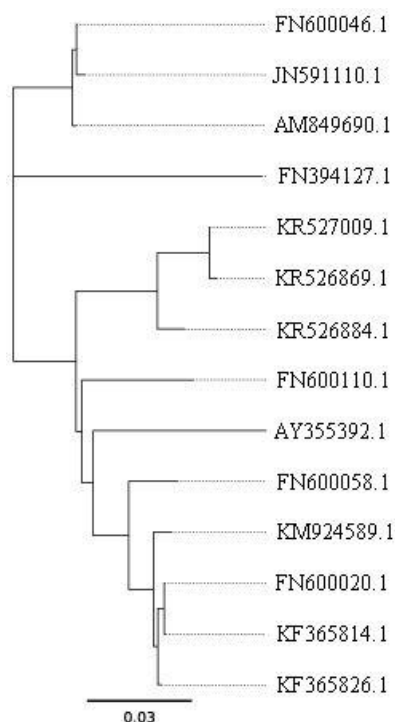
Pärast sekveneerimistulemuste seast ebakvaliteetsete järjestuste väljaselekteerimist ja klastritesse koondamist jäi tulemusi kokku 254 algset OTUd. Alles ei jäänud ühtegi amplifitseeritud *mmoX* geeni järjestuste OTUd ning tulemusi ei saadud ka ühest zooplankteri proovist (millest loomad olid eemaldatud). Kõik järgnevad andmed põhinevad *pmoA* geenijärjestuste analüüsil.

Kõikidest proovidest (settest, veest ja loomade väljaheidetest) tuvastatud bakterite seast olid 87 (34,3%) alfa proteobakterid ning kõik neist määratud perekonna tasemeni. Kõik kuuluvad seltsi *Rhizobiales*, sugukonna *Methylocystaceae* perekonda *Methylocystis* ning üks, zooplankterist tuvastatud järjestus on määratud ka liigini *Methylocystis* sp. 12.1. Gammaproteobakteritest kõik 167 algset OTUd (65,7% kõikidest tulemustest) kuuluvad seltsi *Methylococcales*, sugukonda *Methylococcaceae* ning täpsem jagunemine on erinevate klastrite vahel.

Kõik sekveneerimistulemustest tuvastatud taksonoomilised klastrid (OTUd) on leidumiskoha alusel jaotatuna esitatud lisas 2.

2.3.2 Alfa proteobakterite liigirikkus

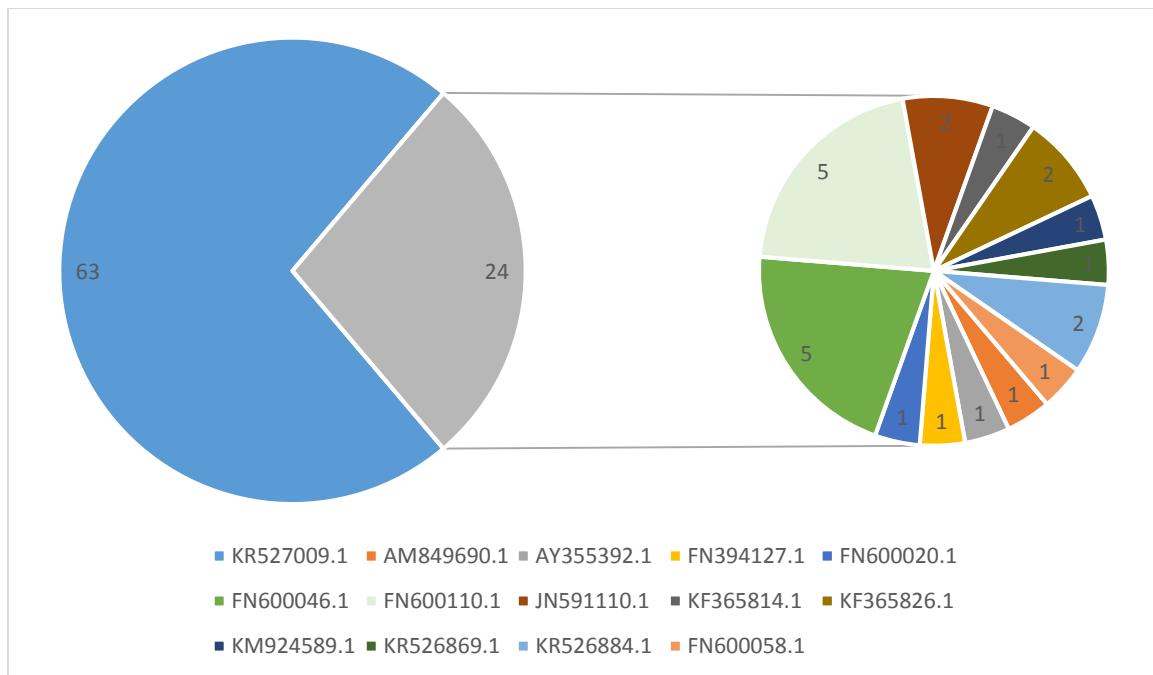
Kõikide proovide alfa proteobakterite seas eristus 14 erinevat järjestuste klastrit, mille üksikjärjestuste joondamine (ClustalW) ja võrdlus programmiga BioEdit Sequence Alignment Editor näitas järjestuste piisavat varieeruvust, et lugeda neid klastreid erinevateks OTUdeks *Methylocystise* perekonna sees.



Joonis 3. Tuvastatud *pmoA* geenijärjestuste alusel loodud fülogeneetiline puu alfabeteobakterite klassi kuulunud OTUdest.

Hironomiidide ja zooplankteri proovide seas ilmnes suur varieeruvus - 16 järjestuse hulgas oli erinevaid OTUsid 9, neist unikaalseid, ainult üks kord esinenud 5.

71 setteproovist pärit järjestust jagunesid 7 erineva OTU vahel. Seejuures esines üks selgelt domineeriv sama päritolu bakteritele viitav grupp 57 järjestusega, mis olid pärit nii avaveelise (juunis ning augustis kogutud) kui makrofüüdi-domineeritud koha sette erinevatest sügavustest (0cm – 1 cm), samuti kuulusid arvukamaisse OTUsse mõlemast veeproovist pärit järjestused. Ülejäänud kuus väiksemat OTUd *Methylocystise* perekonnas olid erinevate piirkondade erinevatest sügavustest pärit metanotroofid.

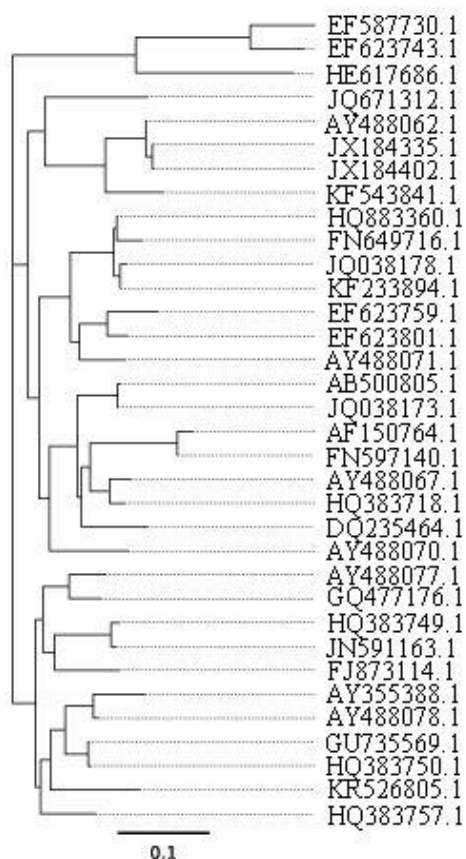


Joonis 4. Kõikidest proovidest pärit alfaaproteobakterite klassi kuuluva perekonna *Methylocystis* sees esinenud OTUde mitmekesisus ja nende arvukus. Erinevad OTUd on tähistatud GenBank viitenumbritega.

Arvukaimalt esinenud OTU (GenBanki viitenumber KR527009.1) on eraldatud suure eutroofse järve settest (Yang jt. 2016).

2.3.3 Gammaproteobakterite liigirikkus

Gammaproteobakterite järjestuste võrdlemine programmiga BioEdit Sequence Alignment Editor näitas, et mõned esialgu 86% järjestuste sarnasuse alusel OTUdesse klasterdatud rühmad erinesid teineteisest vaid mõne (kuni 3) nukleotiidi poolest. Selline järjestuste sarnasus ilmnis ühel juhul kolme klatri vahel, ning teisel juhul kahe klatri vahel. Mõlemal juhul loeti vastavad järjestused ühte OTUusse kuuluvaks. Mitmekesisus gammaproteobakterite *Methylococcaceae* sugukonnas oli seega 31 erinevat OTUd.



Joonis 5. Tuvastatud *pmoA* geenijärjestuste alusel loodud fülogeneetiline puu gamma-proteobakterite klassi kuulunud OTUde GenBank viitenumbritega. Järjestuste võrdlemine näitas, et järjestused viitenumbritega HQ883360.1, JQ038178.1 ning KF233894.1 erinesid teineteisest maksimaalselt 3 nukleotiidi võrra ja loeti seega üheks OTUks. Ühe nukleotiidi võrra erinesid järjestused JX184335.1 ning JX184402.1.

Methylococcaceae sugukonna sees kuuluvad 3 tuvastatud OTUd kultiveeritud ja kirjeldatud perekonda: *Methylobacter*, mis esines üks kord ning oli pärit makrofüüdi-domineeritud mudaseima koha settepinnaalt 0 cm; *Methylocaldum*, mis esines samuti üks kord - surusääsevastse soolesisust ning *Methylococcuse* perekonnas tüüp Ib RPC (*rice paddy cluster*) hulka kuuluv OTU. Viimane esines arvukalt, 33 sellesse gruppi kuuluvat OTUd tuvastati erinevatest keskkondadest – nii liivaste (joonis 1, punktid B, C) kui makrofüüdirohket (joonis 1, punktid D, E) piirkonna sette kõikidest sügavustest, kanali (joonis 1, punkt D) veest ning surusääsevastsete soolesisust. See oli arvukaimalt esinenud OTU gammaproteobakterite hulgas. Ülejäänud OTUd jagunesid seitsme kultiveerimata taksonoomilise grupi vahel. Arvukaimalt oli esindatud klaster FWs, mille alla kuulus 72 OTUd (9 erinevat), kuid suurem varieeruvus esines arvukuse poolest teises, LWs klastris, kus 46 OTU seas erinevaid oli 10.

2.3.4 Metanotroofide varieeruvus surusääsevastsete ja zooplankteri proovides

Loomadest tuvastatud 34 klatri seas oli erinevaid OTUsid 20. 16 klatri (47%), milles 9 erinevat OTUd, kuulus alfaaproteobakterite hulka. Gammaaproteobakterite 11 erinevasse OTUusse kuulunud 18 järjestust jagunesid 6 taksonoomilise klatri vahel, neist enim *Methylococcaceae* tüüp Ib klattrisse FWs.

2.3.5 Metanotroofide varieeruvus sette- ja veeproovides

Setteproovidest pärit klastreid oli 207, nende hulgas 31 erinevat OTUd. Pinnaseproovidest 66 klatri (31,9%) kuulusid alfaaproteobakteritele (mille hulgas 7 erinevat OTUd) ning 141 (68,1%) gammaaproteobakteritele (24 erinevat OTUd). Viimaste seas jagunesid leitud järjestused 8 erinevasse taksonoomilisse gruppi *Methylococcaceae* sees.

18 proovi oli pärit liivasemast, avatud veeväljaga piirkonnast (joonis 1, punktid B ja C), 15 proovi makrofüüdi-domineeritud, pehmemast pinnasest. Avaveekoha OTUdest kuulus alfaaproteobakterite hulka 22,8% ning makrofüüdi-domineeritud, varjulise kohast tuvastatud OTUdest kuulus alfaaproteobakterite klassi 45,2%. Liivasemast settest tuvastati 23 erinevat OTUd ning makrofüüdirohkest piirkonnast 15.

Veeproovidest leiti 13 OTUd, nende hulgas 6 erinevat. 38% klattritest kuulus samasse OTUusse alfaaproteobakterite *Methylocystis* perekonnas. Veest tuvastatud taksonoomilised klattrid olid sarnased sama koha settest tuvastatud OTUdega, kuid leidis ka tüüp Ib RPCs klattrisse kuuluvaid OTUsid, mida sama koha settest ei tuvastatud.

2.4 Arutelu

Läbiviidud töö tulemustest selgus, et metanotroofsed bakterid on surusääsevastsete seedetraktist tuvastatavad *pmoA* geeni alusel. See näitab, et sette- ja pinnaseproovide analüüsiks kasutatav meetod (PowerSoil DNA ekstraheerimiskit) on edukalt rakendatav ka nende organismide sooleeraldise uurimiseks. Lisaks näitab positiivne tulemus seda, et inkubeeritud vastsete arv (umbes 10 isendit proovi kohta) ning inkubeerimisaeg (5 tundi) on piisav vajaliku hulga soolesisu kogumiseks. Sobilik on ka inkubeerimismeetod, kus loomad steriliseeritud vees ise soolesisu eraldavad – ei pea kasutama invasiivseid meetodeid, kus sooltoru välja lõigatakse. Meetod on kasutatav ka zooplankterite maosisu analüüsiks.

Saadud tulemused on otseseks tõendiks, et surusääskede vastsed tarbivad Võrtsjärves toiduks ka metanotroofe. See on kooskõlas varasema uurimusega, milles sama järeldus tehti süsiniku stabiilsete isotoopide analüüsi põhjal (Agasild jt. 2014). Süsiniku stabiilsete isotoopide

analüüs võimaldab tulemusi näha teatud hilinemisega (kui metaanisüsinik on juba biomassi integreerunud), kuid maosisu analüüs näitab hetkeseisu. On võimalik, et osa tuvastatud metanotroofe pärines ka surusääsevastsete kehapiinnalt, kuna baktereid ei oleks olnud võimalik vastsetelt eemaldada ilma loomi kahjustamata. Kuid kuna inkubeerimise ajal puudusid metanotroofide paljunemiseks sobivad tingimused, võib eeldada, et suurem osa tuvastatud metanotroofidest pärinevad maosisust. Et kindlasti vältida inkubatsioonivedelikku sattuda võinud metanotroofide kaasamist, võiks katse kordamisel alternatiivne võimalusena kasutada suurema pooriläbimõõduga filtrit. See võimaldaks bakteritel, kes ei pärinenud soolesisust, filtrist läbi minna.

Liivase ja orgaanikarohke sette võrdlusest on näha, et liivasemate paikade settest tuvastati rohkem erinevaid OTUsid (ühest proovivõtukohest keskmiselt 55) kui orgaanikarohkest settest (keskmiselt 35 erinevat OTUd). Erinevus võib tulla sellest, et avaveelise hapnikurohke veega kohas on metanotroofide elupaigaks sete ning vees neid ei esine (mida näitas ka antud uurimus), samas kui järve varjulises orgaanikarohke settega paigas on hapnikuolud sellised, et MOBid saavad elada ka sette kohal vees ning metanotroofide mitmekesisus on jaotunud nende kahe keskkonna vahel. Seda võimalust toetab ka punktist D kogutud veeproovist selliste OTUde tuvastamine, mida sama koha settes ei leidunud.

Setteproovide erinevate sügavuste võrdluses (0 cm, 0,5 cm ja 1 cm) ei ilmne märkimisväärsed erinevusi metanotroofide arvukuses või taksonoomilises koosseisus, seega ei saanud kinnitust eeldus, et avavees esineb metanotroofiat eelkõige sügavamates settekihtides. Eri sügavustes olid sarnased ka alfa- ja gammaproteobakterite suhted – alfaproteobakterite osakaal oli vastavalt 30,9%, 32,0% ning 32,5%. Samuti olid suures osas sarnased erinevatel ajahetkedel (juuni või august) kogutud proovidest tuvastatud OTUd.

Kummastki liivase sette kohalt võetud veeproovist metanotroofe ei tuvastatud, mis vastab eeldusele, et selliste piirkondade hästi aereeritud vesi ei sobi metanotroofide elukohaks.

Kõikidest OTUdest esindas ligikaudu kaks kolmandikku tüüp I MOBe. See näitab, et gammaproteobakterite seas on tuvastatud metanotroofide liigiline mitmekesisus suurim, mis on ilmnunud ka Kniefi uurimusest (Knief 2015). Suurem osa gammaproteobakterite hulka kuulunud tuvastatud OTUdest esindasid seni kultiveerimata gruppe, seejuures peaaegu kõik (2 OTUd kuulusid tüüp Ib hulka) tüüp Ib erinevatesse klastritesse. Arvukamalt leidsid FWs ja LWs klastrite OTUsid. Mõlemaid klastreid on tüüpiliselt tuvastatud mageveelistest järvedest (Dumont jt. 2014).

mmoX geeni amplifitseerimisel suures osas proovidest negatiivse tulemuse saamine oli ootuspärane tulemus, kuna selle geeni poolt kodeeritav ensüüm esineb vaid vähestel metanotroofidel ning selle poolt kodeeritud ensüümi sMMO esinemine varieerub perekonna ja isegi liigi tasemel (Knief 2015). Samas võib positiivsete tulemuste saamine varjulisemast tuulte mõjule vähem avatud makrofüütide rohkest piirkonnast viidata sellele, et sellistes kohtades (kus ka hapniku kontsentratsioon veesambas põhja lähedal võib madalam olla) on metanotroofide liigiline varieeruvus või isendite hulk suurem. Võimalik, et kas MOBide hulk on sarnane teiste piirkondadega, kuid ühes paigas on esindatud erinevamad OTUd (sealhulgas sellised, mis omavad *mmoX*'i) – või on isendite hulk suurem ning kogutud settematerjali hulgast oli suurem tõenäosus tuvastatavas koguses leida *mmoX*'i omavaid baktereid. *mmoX* geeni tuvastamine varjulise, taimestikurohke koha veeproovist võib näidata, et hapnikuolud on sellises piirkonnas sobivad metanotroofide elutsemiseks veesambas, teisalt võib positiivne tulemus veeproovis olla tingitud sellest, et antud kärni settepinnalt oli veidi tahket settematerjali gaasimullide tõttu veesambasse suspendeerunud ning tuvastatud metanotroofid võisid pärineda sellest. Seetõttu peaks edaspidi veeproove koguma koha peal järvest, mitte hiljem kogumistoru puursüdami kohalt ning veeproove peaks võtma enne setteproovi võtmist, et tagada proovide puhtus.

pmoA geeni alusel tuvastatud metanotroofide liigilises mitmekesisuses ilmnes varieeruvus ka ühest kohast võetud erinevate paralleelide vahel – punkt C 0,5 cm sügavusel oli erinevus isegi 5 OTUd. Seetõttu on oluline ühest kohast mitmete paralleelsete proovide kogumine, mis annab terviklikuma ülevaate paiga liigirohkusest. Paralleelide varieeruvus võis olla põhjustatud sellest, et kuna töö eesmärgiks ei olnud kvantitatiivsete analüüside läbiviimine, ei olnud kogutud sette kogused, millest DNA ekstraheeriti, täpselt ühesugused. Tulemusi võis mõjutada ka setteproovide suur veesisaldus. Kuivaine osakaal Võrtsjärve pindmistes mudakihtides jääb alla 10% sette märgkaalust (Tšertova jt. 2011). Ekstraheerimiskiti protokollis lähtuti pinnaseproovi kaalust, mida antud töös ei mõõdetud ning veerikka setteproovi kaal võis ületada protokollis märgitud. Seejuures võis veerikas proov sisaldada nii palju lahustunud orgaanilisi aineid, et inhibiitorite eemaldamine proovidest oli vähem efektiivne. Inhibiitorid võivad mõjutada DNA amplifitseerimise edukust. Paralleelsete proovide vahel ilmnenu mitmekesisuse varieeruvus võib tuleneda ka sellest, et sekveneerimistulemustest ei olnud kõik lugemid kasutatavad.

Kuna sekveneerimisandmete kasutamisel ilmnes probleeme *paired-end* fragmentide liitmisega üheks järjestuseks ebapiisava kattuvuse tõttu, võiks edasistes töodes kasutada 300 bp pikkuste järjestuste sekveneerimist. Kasutatud praimerite abil amplifitseeritud *pmoA*

geenifragmendid olid pikkusega 470 bp (Costello ja Lidstrom 1999) ning teoreetiliselt oleks pidanud kasutatud 250 bp pikkuste järjestuste sekveneerimine olema piisav, kuid järjestuste otstest saadud tulemused on tihti ebaühtlase kvaliteediga ja seega ebausaldusväärsed. Antud töös ei olnud kasutatavad umbes pooled järjestustest.

Käesolev uurimus ei võimalda anda kvantitatiivseid hinnanguid metanotroofide esinemise kohta. Järgmise sammuna võiks püüda kvantitatiivsete meetoditega uurida, kas on erinevusi metanotroofide rohkuses surusääsevastsete maosisus ja sette bakterikoosluses üldiselt. See võimaldaks leida kinnitust hüpoteesile, et vastsed loovad ise settekäike uuristades metanotroofide kasvuks sobivaid tingimusi, soodsas kasvukohas nende arvukus kasvab ning settekäikudes elavate vastsete toidust moodustavad metanotroofsed bakterid suhteliselt suurema osa (Jones ja Grey 2011).

Kirjanduse loetelu

- Agasild, H., P. Zingel, L. Tuvikene, A. Tuvikene, H. Timm, T. Feldmann, J. Salujõe, K. Toming, R. I. Jones and T. Nõges (2014). "Biogenic methane contributes to the food web of a large, shallow lake." Freshwater biology **59**(2): 272-285.
- Bastviken, D., J. Cole, M. Pace and L. Tranvik (2004). "Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate." Global biogeochemical cycles **18**(4).
- Beal, E. J., C. H. House and V. J. Orphan (2009). "Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation." Science **325**(5937): 184-187.
- Boetius, A., K. Ravensschlag, C. J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann, B. B. Jorgensen, U. Witte and O. Pfannkuche (2000). "A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane." Nature **407**(6804): 623-626.
- Bolin, B., C. Keeling, R. Bacastow, A. Bjorkstrom and U. Siegenthaler (1981). Carbon cycle modelling, Scientific Committee on Problems of the Environment of the International Council of Scientific Unions by Wiley.
- Borrel, G., D. Jezequel, C. Biderre-Petit, N. Morel-Desrosiers, J. P. Morel, P. Peyret, G. Fonty and A. C. Lehours (2011). "Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems." Research in microbiology **162**(9): 832-847.
- Bourne, D. G., I. R. McDonald and J. C. Murrell (2001). "Comparison of pmoA PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils." Applied and environmental microbiology **67**(9): 3802-3809.
- Bunn, S. E. and P. I. Boon (1993). "What sources of organic carbon drive food webs in billabongs? A study based on stable isotope analysis." Oecologia **96**(1): 85-94.
- Cole, J. J., Y. T. Prairie, N. F. Caraco, W. H. McDowell, L. J. Tranvik, R. G. Striegl, C. M. Duarte, P. Kortelainen, J. A. Downing and J. J. Middelburg (2007). "Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget." Ecosystems **10**(1): 172-185.
- Conrad, R. (2009). "The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved." Environmental microbiology reports **1**(5): 285-292.
- Conrad, R., O. Chan, P. Claus and P. Casper (2007). "Characterization of methanogenic Archaea and stable isotope fractionation during methane production in the profundal sediment of an oligotrophic lake (Lake Stechlin, Germany)." Limnology and oceanography **52**(4): 1393.
- Costello, A. M. and M. E. Lidstrom (1999). "Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments." Applied and environmental microbiology **65**(11): 5066-5074.
- Cremona, F., H. Timm, H. Agasild, I. Tõnno, T. Feldmann, R. Jones and T. Nõges (2014). "Benthic foodweb structure in a large shallow lake studied by stable isotope analysis." Freshwater Science **33**(3): 885-894.
- Dedysh, S. N., W. Liesack, V. N. Khmelenina, N. E. Suzina, Y. A. Trotsenko, J. D. Semrau, A. M. Bares, N. S. Panikov and J. M. Tiedje (2000). "*Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs." International journal of systematic and evolutionary microbiology **50 Pt 3**: 955-969.

- Downing, J., Y. Prairie, J. Cole, C. Duarte, L. Tranvik, R. Striegl, W. McDowell, P. Kortelainen, N. Caraco and J. Melack (2006). "The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments." Limnology and Oceanography **51**(5): 2388-2397.
- Dumont, M. G., C. Lüke, Y. Deng and P. Frenzel (2014). "Classification of pmoA amplicon pyrosequences using BLAST and the lowest common ancestor method in MEGAN." Front Microbiol **5**: 34.
- Dunfield, P. F., S. E. Belova, A. V. Vorob'ev, S. L. Cornish and S. N. Dedysch (2010). "Methylocapsa aurea sp. nov., a facultative methanotroph possessing a particulate methane monooxygenase, and emended description of the genus Methylocapsa." International journal of systematic and evolutionary microbiology **60**(Pt 11): 2659-2664.
- Galloway, J. N., A. R. Townsend, J. W. Erisman, M. Bekunda, Z. Cai, J. R. Freney, L. A. Martinelli, S. P. Seitzinger and M. A. Sutton (2008). "Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions." Science **320**(5878): 889-892.
- Garcia, J. L., B. K. Patel and B. Ollivier (2000). "Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea." Anaerobe **6**(4): 205-226.
- Grey, J., A. Kelly, S. Ward, N. Sommerwerk and R. I. Jones (2004). "Seasonal changes in the stable isotope values of lake-dwelling chironomid larvae in relation to feeding and life cycle variability." Freshwater Biology **49**(6): 681-689.
- Griggs, D. J. and M. Noguer (2002). "Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change." Weather **57**(8): 267-269.
- Hanson, R. S. and T. E. Hanson (1996). "Methanotrophic bacteria." Microbiological reviews **60**(2): 439-471.
- Hedderich, R. and W. B. Whitman (2006). Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea. The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt. New York, NY, Springer New York: 1050-1079.
- Hinrichs, K. U., J. M. Hayes, S. P. Sylva, P. G. Brewer and E. F. DeLong (1999). "Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments." Nature **398**(6730): 802-805.
- Hou, S., K. S. Makarova, J. H. Saw, P. Senin, B. V. Ly, Z. Zhou, Y. Ren, J. Wang, M. Y. Galperin, M. V. Omelchenko, Y. I. Wolf, N. Yutin, E. V. Koonin, M. B. Stott, B. W. Mountain, M. A. Crowe, A. V. Smirnova, P. F. Dunfield, L. Feng, L. Wang and M. Alam (2008). "Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, Methylacidiphilum infernorum, a representative of the bacterial phylum Verrucomicrobia." Biology direct **3**: 26.
- Islam, T., S. Jensen, L. J. Reigstad, Ø. Larsen and N.-K. Birkeland (2008). "Methane oxidation at 55 °C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum." PNAS **105**(1).
- Jędrysek, M.-O. (2010). "Depth of the water column in relation to carbon isotope ratios in methane in freshwater sediments." Geological Quarterly **49**(2): 151-164.
- Jones, R. I. and J. Grey (2011). "Biogenic methane in freshwater food webs." Freshwater Biology **56**(2): 213-229.

- Junier, P., O.-S. Kim, W. Eckert, P. Casper, J. F. Imhoff, K.-P. Witzel and O. Hadas (2010). "Methane-and ammonia-oxidizing bacteria at the chemocline of Lake Kinneret (Israel)." Aquatic microbial ecology **58**(3): 241-248.
- Kankaala, P., S. Taipale, L. Li and R. I. Jones (2010). "Diets of crustacean zooplankton, inferred from stable carbon and nitrogen isotope analyses, in lakes with varying allochthonous dissolved organic carbon content." Aquatic Ecology **44**(4): 781-795.
- Knief, C. (2015). "Diversity and Habitat Preferences of Cultivated and Uncultivated Aerobic Methanotrophic Bacteria Evaluated Based on pmoA as Molecular Marker." Front Microbiol **6**: 1346.
- McDonald, I. R., E. M. Kenna and J. C. Murrell (1995). "Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR." Applied and environmental microbiology **61**(1): 116-121.
- Murrell, J. C., B. Gilbert and I. R. McDonald (2000). "Molecular biology and regulation of methane monooxygenase." Archives of microbiology **173**(5-6): 325-332.
- Op den Camp, H. J., T. Islam, M. B. Stott, H. R. Harhangi, A. Hynes, S. Schouten, M. S. Jetten, N. K. Birkeland, A. Pol and P. F. Dunfield (2009). "Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia." Environmental microbiology reports **1**(5): 293-306.
- Panganiban, A. T., Jr., T. E. Patt, W. Hart and R. S. Hanson (1979). "Oxidation of methane in the absence of oxygen in lake water samples." Applied and environmental microbiology **37**(2): 303-309.
- Peterson, B. J. and B. Fry (1987). "Stable isotopes in ecosystem studies." Annual review of ecology and systematics: 293-320.
- Pol, A., K. Heijmans, H. R. Harhangi, D. Tedesco, M. S. Jetten and H. J. Op den Camp (2007). "Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobia species." Nature **450**(7171): 874-878.
- Raghoebarsing, A. A., A. Pol, K. T. van de Pas-Schoonen, A. J. Smolders, K. F. Ettwig, W. I. Rijpstra, S. Schouten, J. S. Damste, H. J. Op den Camp, M. S. Jetten and M. Strous (2006). "A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification." Nature **440**(7086): 918-921.
- Reeburgh, W. S. (2007). "Oceanic methane biogeochemistry." Chemical reviews **107**(2): 486-513.
- Zehnder, A. J. and T. D. Brock (1980). "Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology." Applied and environmental microbiology **39**(1): 194-204.
- Thauer, R. K. and S. Shima (2008). "Methane as fuel for anaerobic microorganisms." Annals of the New York Academy of Sciences **1125**: 158-170.
- Tšertova, N., A. Kisand, H. Tammert and V. Kisand (2011). "Low seasonal variability in community composition of sediment bacteria in large and shallow lake." Environmental microbiology reports **3**(2): 270-277.
- Wen, X., S. Yang and S. Liebner (2016). "Evaluation and update of cutoff values for methanotrophic pmoA gene sequences." Archives of microbiology.
- Vorobev, A. V., M. Baani, N. V. Doronina, A. L. Brady, W. Liesack, P. F. Dunfield and S. N. Dedysh (2011). "*Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase."

International journal of systematic and evolutionary microbiology **61**(Pt 10): 2456-2463.

Vuorio, K., M. Meili and J. Sarvala (2006). "Taxon-specific variation in the stable isotopic signatures ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of lake phytoplankton." Freshwater Biology **51**(5): 807-822.

Yang, Y., Q. Zhao, Y. Cui, Y. Wang, S. Xie and Y. Liu (2016). "Spatio-temporal Variation of Sediment Methanotrophic Microorganisms in a Large Eutrophic Lake." Microbial ecology **71**(1): 9-17.

Yasuno, N., S. Shikano, A. Muraoka, T. Shimada, T. Ito and E. Kikuchi (2012). "Seasonal increase of methane in sediment decreases $\delta^{13}\text{C}$ of larval chironomids in a eutrophic shallow lake." Limnology **13**(1): 107-116.

Lisad

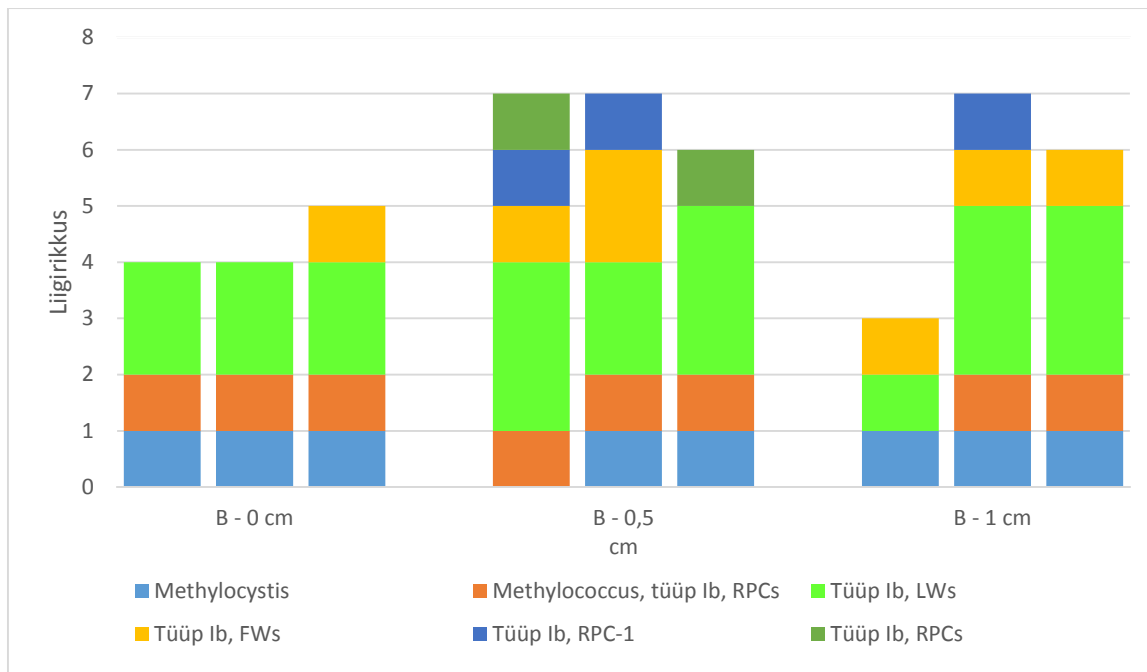
Lisa 1

2015. aastal kogutud keskkonnaproovide PCRi tulemuslikkus (hinnatud geelelektroforeesi UV-pildi järgi). Igast sette sügavusest koguti kolm paralleeli, veeproovide puhul kolm või kaks. Kõikide proovidega viidi läbi PCR nii *pmoA* kui *mmoX* geeni amplifitseerimiseks. Kõik „+“ märgitud proovid saadeti ka sekveneerimisse.

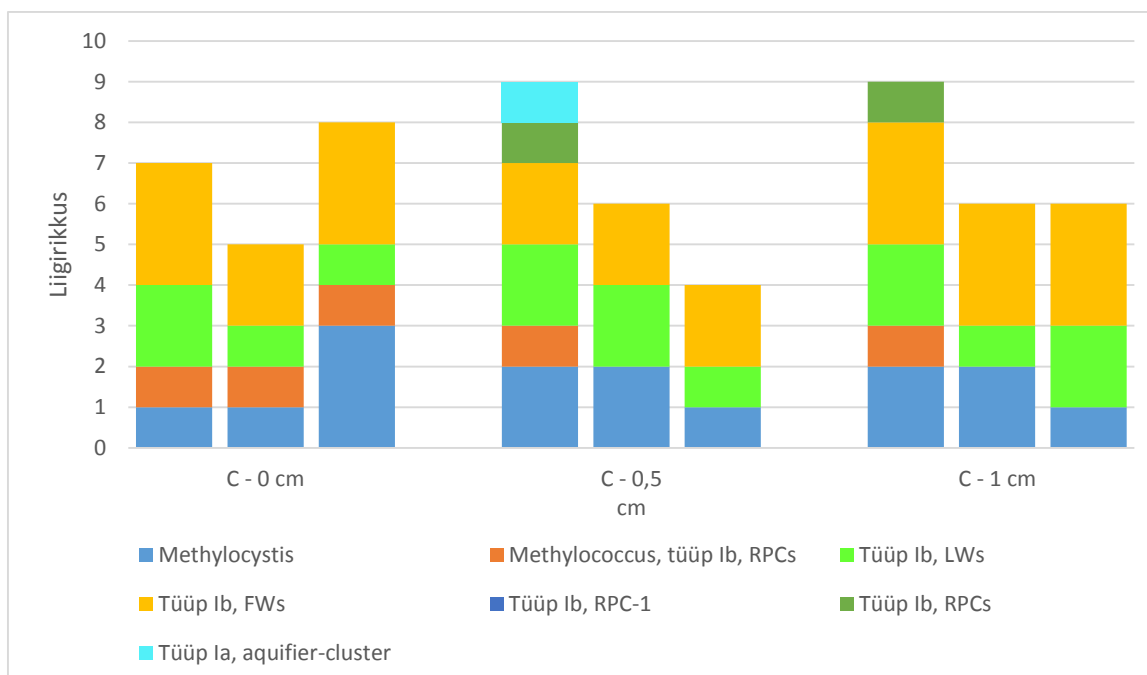
Proovi kogumise koht (joonis 1)	Proovi kogumise sügavus	PCR <i>pmoA</i> geeniga	PCR <i>mmoX</i> geeniga	Koha kirjeldus
Punkt B	vesi	---	---	Liivane, avaveeline piirkond Tondisaarest põhjas. Kogutud 18. augustil
	0 cm	+++	---	
	0,5 cm	+++	---	
	1 cm	+++	---	
Punkt C	vesi	--	--	Liivane avaveeline piirkond. Kogutud 26. juunil
	0 cm	+++	---	
	0,5 cm	+++	---	
	1 cm	+++	---	
Punkt D	vesi	++	+-	Orgaanikarikas, makrofüüdirohke piirkond. Gaasimullide tõttu veidi segunenud. Kogutud 26. juunil
	0-0,5 cm	+++	---	
	0,5-1 cm	+++	---	
Punkt E	0 cm	+++	+--	Orgaanikarikas, makrofüüdirohke koht paadikanali roostikust. Kogutud 26. juunil
	0,5 cm	+++	+--	
	1 cm	+++	+--	

Lisa 2

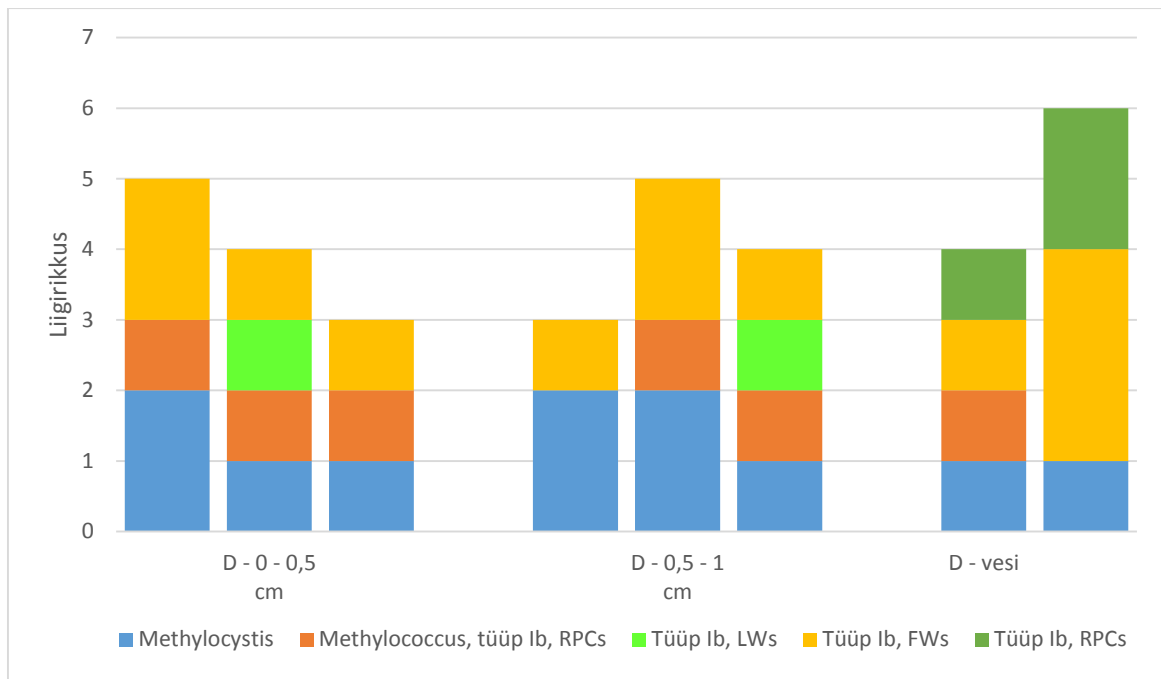
Sekveneerimistulemused. Igas diagrammis on esitatud ühest kogumispunktist (tähistused vastavad joonis 1-s märgitule) tuvastatud erinevate OTUde arv. Kui perekonda märgitud ei ole, kuulub OTU taksonoomilisse klastrisse *Methylococcaceae* sugukonnas.



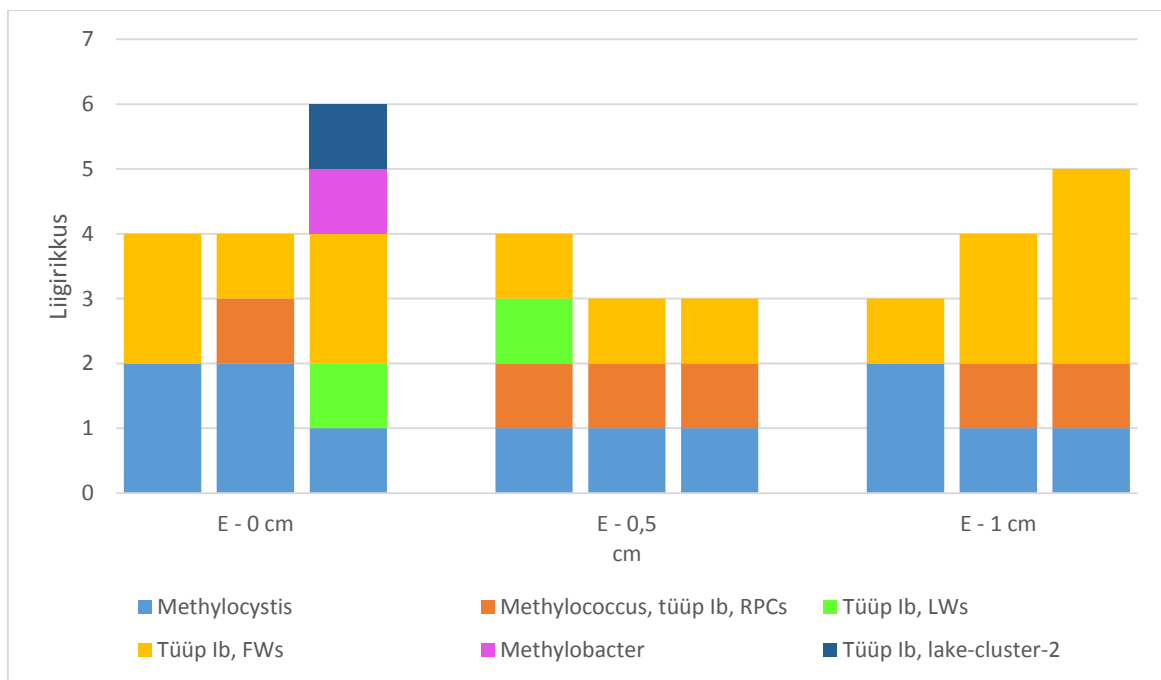
Joonis 6. Punktist B kogutud setteproovid. Tulbad on grupeeritud nii, et koos on ühelt sügavuselt kogutud kolm paralleelset proovi.



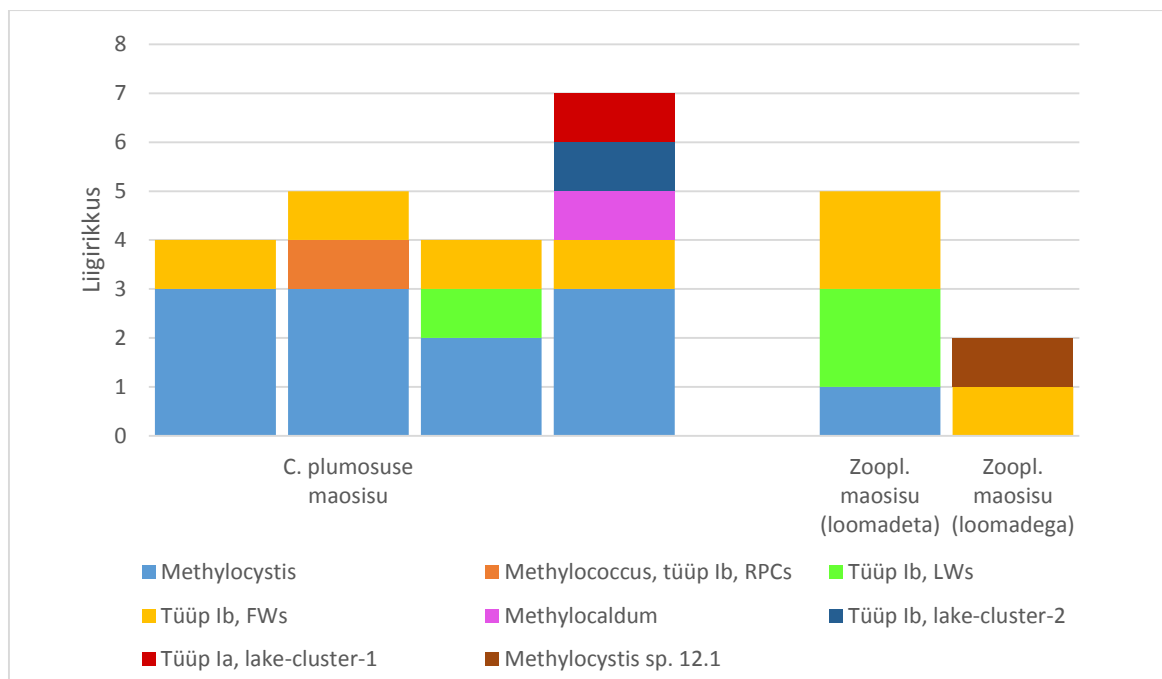
Joonis 7. Punktist C kogutud setteproovid. Tulbad on grupeeritud nii, et koos on ühelt sügavuselt kogutud kolm paralleelset proovi.



Joonis 8. Punktist D kogutud setteproovid. Tulbad on grupeeritud nii, et koos on ühelt sügavuselt kogutud kolm paralleelset proovi.



Joonis 9. Punktist E kogutud setteproovid. Tulbad on grupeeritud nii, et koos on ühelt sügavuselt kogutud kolm paralleelset proovi.



Joonis 10. Punktist A kogutud surusääsevastete ning zooplankterite maosisu proovid.

Tänu sõnad

Töö autor soovib tänada Eesti Maaülikooli Limnoloogiakeskuse töötajaid, eelkõige Helen Agasilda ja Tõnu Feldmanni, kes kogusid elustikuproove. Samuti võimaldas Limnoloogiakeskus kasutada välitöödeks vajalikke transpordi- ja proovivõtuvahendeid. Sekveneerimisanalüüsid teostati instutsioonaalse uurimistoetuse IUT21-2 "Järvede toiduahelad ja süsiniku metabolism valgala karbonaatsuse ja kliima gradiendis" rahalisel toel. Samuti tänab autor oma juhendajaid meeldiva koostöö ja heade nõuannete eest.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Epp Ainelu

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Metanotroofide identifitseerimine järvesettes ja surusääsevastsete (*Chironomus plumosus*) seedetraktis bakteriaalsete *pmoA* ja *mmoX* geenide esinemise abil“

mille juhendajad on PhD Veljo Kisand ja PhD Anu Kisand

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus 24.05.2016